

坐骨神经源性因子对培养中成年青蛙背根节神经元的作用

谢富康¹, 郑敏²

(中山医科大学 1. 组织学与胚胎学教研室, 广东 广州 510089; 2. 肿瘤医院妇科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨离断的坐骨神经(sciatic nerve, SN)分泌的可溶性因子对培养中的成年青蛙背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经突起生长及形态学的影响。【方法】分离成年青蛙 DRG 神经元培养于含有离断的 SN 条件性培养基(SNCM)中, 检测 SNCM 促进神经突起生长的量效和时效作用及对生长的神经突起形态学的影响。【结果】在 0.1~5 mg/L 蛋白质质量浓度范围内, SNCM 促进神经突起生长的作用有蛋白质质量浓度依赖关系。在培养的第 1 天, 实验组平均神经突起长度是对照组的 3.9 倍, 培养 3 d 后实验组神经元突起平均长度已达对照组神经元的 9.2 倍, 实验组和对照组两者有显著的差异($P < 0.001$)。且实验组神经元生长出的突起缺乏对照组神经元那种典型的片层状伪足。活性因子的分子质量介于 30~100 ku 之间。【结论】离断的外周神经可释放可溶性的因子促进离体培养的成年 DRG 神经元突起的生长并影响突起的形态。

关键词: 神经节, 脊/药物作用; 坐骨神经/分泌; 神经元/药物作用; 神经再生

中图分类号: R338.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0092-04

Effects of Sciatic Nerve Derived Factors on Cultured Adult Frog DRG Neurons

XIE Fu-kang¹, ZHENG Min²

(1. Department of Histology and Embryology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510089, China;
2. Department of Gynecology, Cancer Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of diffusible factors secreted from the denervated sciatic nerve on the neurites growth and morphological changes of neurons from adult frog dorsal root ganglion (DRG) in the culture.【Methods】Neurons dissociated from adult frog DRG were cultured with the conditioned medium (CM) of denervated sciatic nerve. The average length of the processes of the cultured neurons was measured and the morphology of the neurons was examined after 1, 3, and 5 days of culture.【Results】Between the range of 0.1~5 μg/ml, CM had an obvious effect in promoting the outgrowth of DRG neurites with a protein concentration-dependent relation. The average process length of DRG neurons was 3.9 times that of the control neurons in the first day of culture and 9.2 times after 3 days in culture. The differences were significance between experiment and control groups ($P < 0.001$). In addition, the neurites of DRG neurons in the experiments groups lacked lamellipodia that is typical on processes of control neurons. The molecular weigh of the active factors was between 30 ku to 100 ku.【Conclusion】The denervated peripheral nerve can release diffusible factors to promote the outgrowth and influence the morphology of neurites of DRG neurons in culture.

Key words: ganglion, spinal/drug effects; sciatic nerve/secretion; neuron/drug effects; nerve regeneration

周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)和中枢神经系统(central nervous system,

收稿日期: 1999-09-03

基金项目: 国家自然科学基金(39970237)、CM B(98677)和“211工程”资助项目(98142)

作者简介: 谢富康(1955-),男,安徽合肥人,博士,教授,主要研究神经组织的发育与再生。

CNS)的再生能力明显不同。移植成体 PNS 到 CNS 能明显地帮助 CNS 轴突的生长^[1]。实验证明这种作用是由于外周神经为再生的轴突生长提供了支架。此外,外周神经还可释放促进和诱导突起生长的化学性因子,包括有神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养素 3(neurotrophin-3, NT-3)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)等^[2]。上述这些神经营养因子(neurotrophic factor, NTF)对发育过程中神经元的存活、分化及特征的维持起着重要作用。但它们对成体神经元的作用如何却知之甚微^[3]。当动物成年后,各种神经元对 NTF 的依赖减少,但并没有完全丧失,尤其在神经损伤后的再生过程中 NTF 发挥着重要的作用。NTF 在受损神经和未损神经中的表达有明显的差异。一些 NTF 如 BDNF、NGF 的 mRNA 在未损神经中仅为低水平的表达,而当外周神经受损后表达水平急剧升高。本研究的目的是要确定离断的外周神经是否释放可溶性的神经营养活性物质影响培养的成年动物 DRG 神经元突起的生长及形态学变化。

1 材料和方法

1.1 制备坐骨神经条件性培养基

将体长约 5 cm 成年实验青蛙(雌雄不限)冰冻麻醉,取坐骨神经约 4 cm 长,剥除神经束膜,用 L-15 培养液冲洗 4 次,培养于 3 mL L-15 培养液中,从第 7 天开始每 3 d 收集 1.5 mL 坐骨神经条件培养液(scialic nerve conditioned media, SNCM),每次收集后再补加 1.5 mL 新鲜培养基,维持总容积为 3 mL,重复此过程共 7 次,每条培养的坐骨神经共收集 SNCM 10.5 mL,1 000 r/min 离心 10 min,除去细胞碎片,取上清备用。收集的一部分 SNCM 上清经分子浓缩器(Millipore)按蛋白的大小分为 3 个组份:< 30 ku, 30 ~ 100 ku, > 100 ku 组。调整各组份蛋白含量为 0.1 g/L。分别测试各组份对 DRG 神经元的生物活性。

1.2 DRG 神经元的分离培养

在无菌条件下取出成年青蛙 DRG,用新鲜培养液冲洗 3 次后切成直径约 1 mm³ 小块,加 8 g/L 胰酶-L15 中 30 °C 温育 15 min,再置摇床上于室温下振荡 1 h,静置后让组织块沉降,吸除上清,加入

新鲜培养液,用移液器尖头轻轻吹打组织 10 次,待未分离的组织块沉降后收集上清细胞悬液,加入 1 mL 培养液继续吹打,重复上述过程,直至组织块完全分离为细胞悬液。在显微镜下用毛细吸管逐个吸起 DRG 神经元种植于含 4 mL L-15 培养液的 35 mm 培养皿中。加入一定浓度已制备的 SNCM。对照组加入相应浓度的小牛血清白蛋白。置 30 °C 体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱内培养。

1.3 图像分析和数据处理

通过 CCD 数码相机捕捉图像,然后用“图像-1”软件于培养的第 1、3、5 天测量神经突起的平均长度。仅对神经元的突起超过其胞体直径时才予以测量,共测量 6 个实验组,每组不少于 24 个神经元,统计处理用 Sigma-Plot 程序 *t* 检验。

2 结果

2.1 SNCM 促进神经突起生长的量效作用

体外培养 3 d 后,0.1 ~ 10 mg/L 蛋白质质量浓度的 SNCM 对成年青蛙 DRG 神经元突起生长的影响见图 1。除质量浓度为 5 mg/L 和 10 mg/L 两组间无显著性差异($P > 0.05$)外,其余各组间均有极显著性差异($P < 0.001$)。

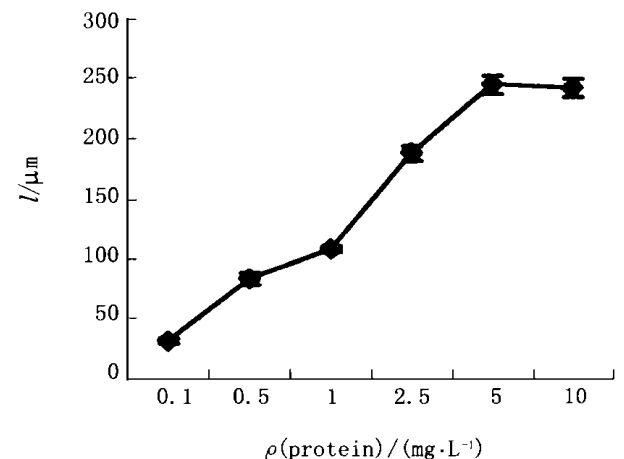


图1 SNCM 促进 DRG 神经元突起生长的量效作用

Fig.1 Dose-dependence of the neurite outgrowth promoting effect of SNCM on DRG neurons

l is the quantity symbol of the length of motoneurons' process

2.2 SNCM 促进神经突起生长的时效作用

为比较坐骨神经释放的因子对突起生长的时效影响,我们在实验组的培养基中加入 100 μ L 的 SNCM,培养 1、3、5 d 后测量各组神经元突起的平均长度。培养 1 d 后,SNCM 共同培养中每个神经

元突起的平均长度是 $104.7 \mu\text{m}$, 为对照的 3.9 倍 ($P < 0.001$), 3 d 后其长度的差异增加到 9.2 倍 ($P < 0.001$), 由第 1 天到第 3 天间是 SNCM 培养中的神经突起生长的一个高峰期; 由第 3 天到第 5 天, 与 SNCM 共同培养组的神经突起继续快速生长, 尽管与对照组突起长度比仅由第 3 天的 9.2 倍增为 9.6 倍, 但平均突起长度已达 $433 \mu\text{m}$ (表 1)。培养 5 d 后对照组神经元开始死亡而 SNCM 共同培养组的神经突起保持继续生长的趋势。

表 1 SNCM 对 DRG 神经元突起长度生长的作用

Table 1 Effects of SNCM on the length of neurite outgrowth of DRG neurons ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

Days in culture	Control($n = 9$)	SNCM($n = 12$)
1	27.0 ± 2.2	$104.7 \pm 4.1^{1)}$
3	34.5 ± 1.8	$317.4 \pm 8.6^{1)}$
5	45.0 ± 1.8	$433.2 \pm 7.8^{1)}$

1) Compared with control group, $P < 0.001$

2.3 SNCM 对突起的形态的影响

SN 释放的因子明显地影响 DRG 神经元突起的形态, 对照组神经元的突起较短、较粗, 有较多的层状伪足(图 2A), 而与 SNCM 共同培养的神经元的突起较细、较直, 没有片层状伪足(图 2B)。

2.4 SNCM 中神经营养活性物蛋白量的初步检测

为确立 SNCM 神经营养活性物质的来源, SNCM 被按蛋白分子的大小分为 3 个组分, 检测对培养中 DRG 神经元突起生长的影响, 结果见表 2。结果 30 ~ 100 ku 组 SNCM 促神经突起生长的作用明显高于 < 30 ku 和 > 100 ku 组 ($P < 0.001$), 而后两组间无显著性差别 ($P > 0.05$)。

表 2 三种蛋白分子质量组份 SNCM 对 DRG 神经元平均突起长度的作用(培养 3 d)

Table 2 Effects of SNCM from three different molecular weights on the average neurites length of DRG neurons (three days in culture) ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	$l_{\text{neuron}} / \mu\text{m}$
Control	34.5 ± 1.8
< 30 ku	33.6 ± 1.9
30 ~ 100 ku	$316.4 \pm 7.9^{1)}$
> 100 ku	33.9 ± 1.8

1) Compared with control, < 30 ku and > 100 ku groups $P < 0.001$

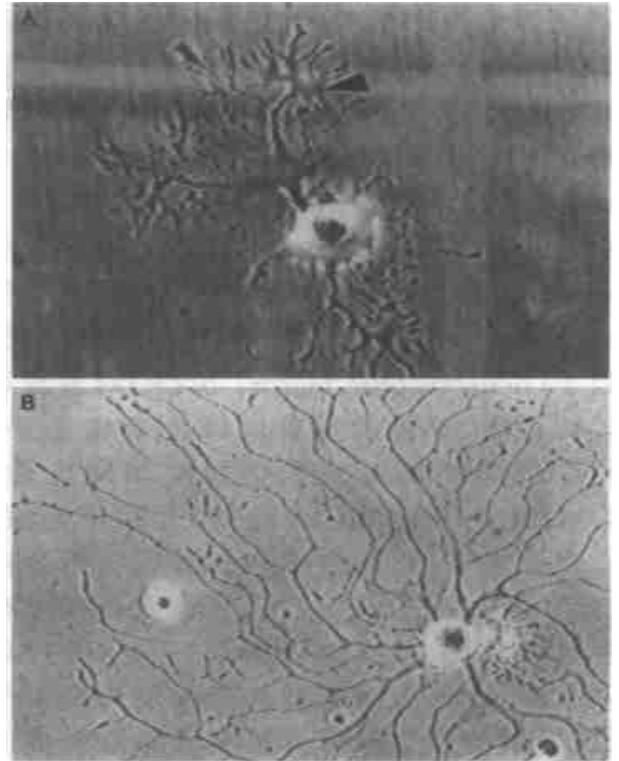


图 2 培养 3 d DRG 神经元相差显微图

Fig. 2 Phase micrographs of cultured DRG neurons in three days of culture

A: A control DRG neuron surrounded by a large lamellopodium (arrowhead) and without any well defined process; B: A DRG neuron cultured in SNCM, with well defined processes without a lamellopodium. calibration bar: $50 \mu\text{m}$

3 讨论

本研究将 SN 单独培养于无血清培养基中, 并于 7 d 后开始收集 CM, 使 SN 有充分的时间对损伤作出反应而产生 NTF 直接分泌入培养基中。为排除血清来源的可能影响因素, 我们使用无血清培养液。

多年来, 大量关于各种 NTF 的研究都是利用胚胎或新生动物体外培养模型来进行的。而极少用成年动物体外培养模型来进行研究。其主要原因是成年神经元较难在体外培养中存活。但神经元在其发育的不同阶段对各种 NTF 的种类和量的需求是不断变化的。胚胎时期 NTF 对神经元的作用可能主要与神经元的存活、成熟、分化和增殖有关。而成年期 NTF 可能对神经元的再生起关键作用。一些 NTF 在胚胎期和成年期的表达量相差甚远⁴⁾。已有研究证明成年动物外周神经仍可产生

和释放 NTF, 并且在受损后一些因子的产生明显上调^[5]。本研究表明 SNCM 明显地促进体外培养成年蛙 DRG 神经元突起的生长。与对照组相比, 差异性在培养的第 1 天就非常明显。到培养的第 3 天实验组 DRG 神经元突起的平均长度已达对照组神经元的 9.2 倍。到培养的第 5 天实验组每个神经元突起的平均长度已达 433 μm 。

培养中神经元的突起末端往往有一膨大, 为“生长锥”, 可呈片层或板状, 亦可伸出一些细小伪足。突起的主轴内有微管, 而片层和丝状伪足中则主要分布为微丝。本实验中对对照组神经元突起大多曲折并有较多的片层状伪足。这种形态提示生长的突起内的细胞骨架没能完善地组合^[6]。而 SNCM 培养组神经突起细、直并缺乏片层状伪足。这种形态表明 SNCM 改变了神经突起内细胞骨架的构筑, 可能是使片层状伪足转变成圆柱状神经突起并以此加快了突起的生长速度。上述结果均表明 SNCM 中确有促进成年青蛙 DRG 神经元突起生长并改变突起形态的生物活性因子。SN 能产生多种 NTF 并都可能促进神经突起的生长, 但至今未见有报道它们会影响神经突起的数目和形态。

为进一步了解本研究中的神经营养活性物质是否与已知的外周神经所产生的 NTF 有别, 我们初步检测了活性物质的分子质量范围。本研究确定了 SNCM 中的神经营养活性存在于分子质量为 30 ~ 100 ku 之间。NGF、BDNF、NT-3、CNTF、FGF、IGF 和 GDNF 是 SN 分泌的几种主要的并对 DRG 神经元具活性的 NTF。但这些 NTF 的分子质量没有是在 30 ~ 100 ku 之间的。三亚基寡聚复合体的 NGF 分子质量为 130 ku, 其 β 亚基具生物活性, 分子质量约 12 ku, CNTF 分子质量为 22 ku,

FGF 家族有多种成员, 分子质量皆为 16 ku 左右, BDNF 的分子质量为 12 ku。IGF 的分子质量为 7.4 ku, 而 TGF 的分子质量更小, 仅为 6 ku。因此, 本研究中所显示的神经营养物很可能是有别于以上所列已知 NTF 新的神经营养活性物质。处于 30 ~ 100 ku 范围内的蛋白种类很多, 本文所揭示的 SNCM 对 DRG 神经元的营养作用究竟是多种蛋白的综合作用还是单一蛋白所为尚须进一步通过蛋白提纯并经生物活性检验来证实。

参考文献:

- [1] Carter D A, Bray G M, Aguayo A J. Long-term growth and remodeling of regenerated retinocollicular connections in adult hamsters [J]. *J Neurosci*, 1994, 14(2): 590.
- [2] Friedman B, Wong V, Lindsay R M. Axons, schwann cells, and neurotrophic factors [J]. *Neuroscientist*, 1995, 1(4): 192.
- [3] Kuffler D P. Promoting and directing axon outgrowth [J]. *Molecular Neurobiol*, 1994, 9(1-3): 233.
- [4] MacLennan A J, Vinson E N, Marks L, *et al*. Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(2): 621.
- [5] Sendtner M, Stockli K A, Thoenen H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration [J]. *J Cell Biol*, 1992, 118: 139.
- [6] Goldberg D J, Burmeister D W. Looking into growth cones [J]. *Trends Neurosci*, 1989, 12(12): 503.

(编辑 刘清海, 张敏瑞)

(上接第 86 页)

点的 θ 值和 Lod Score 值, 应用 LINKAGE 软件首次建立了中国人 WD 基因在 D13q14.2-3 区域的遗传定位图谱和精细遗传定位图谱, 从而对中国人 WD 基因进行了精确定位。在此基础上, 应用 PCR-SSCP 和 PCR-DNA 直接测序法, 对 WD 基因 21 个外显子进行系统分析, 获得中国人 WD 基因 5、8 号外显子高频突变点, 其中 5 号外显子 1716 位 T 插入为国际上首次报道, 是一种新的移码突变, 且发现 WD 基因突变存在杂合丢失 (LOH) 现象。并首次建立了 PCR-酶切分析法及建立 RFLP-单倍体、微卫星 DNA-单倍体连锁分析法对 79 个 WD 家系进行基因筛查, 成功地进行 WD 症状前诊断、早期诊断和杂合子检出。在国内建立了检测 WD 基因突变的 PCR-酶切分析法。同时为了将此成果在我国普及, 本研究在 1997 年卫生部国家继续教育学习班进行推广, 并已在华南地区应用, 取得较大成绩。该成果已于 1998 年获国家教育部科技进步一等奖。

(陈丽芳)